植物病理學會刊　11:33-44, 2002

莧菜葉枯病菌之鑑定與侵染過程

林信甫[1]　謝廷芳[2]　黃振文[1,3]

1. 台中市 國立中興大學植物病理學系
2. 台中縣霧峰鄉 行政院農委會農業試驗所植病系
3. 聯絡作者，電子郵件：jwhuang@dragon.nchu.edu.tw；傳真：04-22851676

接受日期：中華民國90年2月1日

摘　要

林信甫、謝廷芳、黃振文. 2002. 莧菜葉枯病菌之鑑定與侵染過程. 植病會刊11:33-44.

台灣地區有機農場生產的莧菜(*Amaranthus mangostanus* L.)栽培田，最近出現莧菜葉枯病(Rhizoctonia foliage blight)，按照柯霍氏法則(Koch's postulates)系列測試，證實它的病原菌是*Rhizoctonia solani* Kühn [有性世代*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]。將莧菜葉枯病菌*R. solani* RSA-03和RSA-09與*R. solani*標準菌株行菌絲融合群測定，發現兩菌株與*R. solani* AG 2-2 IIIB具有高菌絲融合率(> 70%); 與標準菌株*R. solani* AG 2-1、AG 2-2IV、AG 2-3及AG BI的菌絲融合率則小於5%。探討兩菌株對於硫胺素(thiamine-HCl)的需求，發現莧菜葉枯病菌與標準菌株*R. solani* AG 2-2 IIIB皆屬於營養缺陷菌株。另外莧菜葉枯病菌與標準菌株*R. solani* AG 2-2 IIIB的菌絲生長溫度及生長速度相近，且此標準菌株的菌絲塊對莧菜亦具有病原性，因此將莧菜葉枯病菌鑑定為*R. solani* AG 2-2 IIIB。土壤覆蓋法誘能使莧菜葉枯病菌RSA-03和RSA-09大量產生擔孢子。以擔孢子懸浮液接種於株齡四星期的莧菜植株，在28℃的濕室中保濕，六天後葉片開始出現水浸狀病徵。受害莧菜葉片初期病斑呈圓形，水浸狀的透化小斑，直徑大小約1 mm左右，接著病斑擴展為後期不規則的爪狀斑；病勢擴展迅速時，病斑間會相互癒合，造成葉片枯萎死亡。利用光學與螢光顯微鏡，觀察擔孢子侵染莧菜葉片的過程，發現接種擔孢子9 hr後，發芽管會侵入葉片，18 hr後團狀菌絲形成，直到第21 hr團狀菌絲體會逐漸形成子座般的構造(stroma-like structure)，並存在於病斑中央。

關鍵詞：莧菜、莧菜葉枯病、立枯絲核菌AG 2-2 IIIB、有性世代、擔孢子、侵染過程

緒　言

莧菜(*Amaranth mangostanus* L.)原產於中國及印度，在中國長江流域以南栽培較多；由於其生長期短，栽培容易，可耐高溫，少病蟲害及營養成份高，為夏季重要蔬菜之一[1]。莧菜在亞熱帶的台灣，算是極易栽培的蔬菜，生性強健，適合各地栽培，品種分為白莧、青莧和紅莧[1]。莧菜栽培期間發生的主要病害有：*Albugo bliti* (Biv.) O. Kuntze引起的白銹病、*Athelia rolfsii* (Curzi) Tu et Kimbrough引起的白絹病、*Colletotrichum gloeosporioides* Penzig引起的炭疽病、*Sclerotina sclerotiorum* (Lib.) de Bary引起的菌核病和*Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitwood、*M. javanica* (Treub.) Chitwood引起的根瘤線蟲病[3]。近年來，台灣的有機蔬菜田中發現莧菜遭受*Rhizoctonia solani* Kühn [有性世代*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]為害，出現白色爪狀的病斑[6]，猶如甜菜[10,11,12,13]、大豆[14,15]及煙草[18,19,20]遭到*T. cucumeris*感染所引發的類似症狀。Naito氏報導甜菜、大豆及煙草等寄主遭受*T. cucumeris*擔孢子感染時，會形成類似子座的構造(stroma-like structure)，惟若以菌絲接種植物葉片卻不會有類似的構造出現[16]。目前筆者等調查發現苗栗、西螺、台中及埔里等地的莧菜皆已出現葉枯病徵。仔細觀察該病害在莧菜葉片分佈的情形，發現擔孢子是其主要的感染源[7]。然而，台灣地區出現的莧菜葉枯病，其病原菌是否與國外報導的病原菌有所差異，確有進一步探討的必要性。因此，本文的目的在於鑑定莧菜葉枯病的病原菌及觀察其侵染莧菜葉片的過程。

材料與方法

供試菌株來源

於1999 ~ 2000年夏季與秋季分別赴西螺、苗栗、台中和埔里的莧菜栽培區採集罹患葉枯病之病株，將罹病組

織以1% (v/v) 次氯酸鈉水溶液表面消毒30 sec後，移置於2% (w/v) 水瓊脂培養基(Water agar, WA) 進行組織分離，待菌絲長出後，切取菌絲尖端移至馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(Potato dextrose agar, PDA, Difco) 斜面上培養，共分離取得RSA-01～RSA-14等14個疑似*R. solani*菌株。利用土壤覆蓋法[15] 獲取病菌分離株的擔孢子後，按照柯霍氏法則進行測試，確定各菌株之病原性後，選取RSA-03和RSA-09兩菌株作爲本研究的主要供試菌株。

病原菌鑑定

菌絲融合群測試：取莧菜葉枯病分離菌株RSA-03和RSA-09與立枯絲核菌標準菌株 [*R. solani* AG 2-1 (ATCC 76168)、AG2-2 IIIB (ATCC 76124)、AG 2-2 IV (ATCC 76125)、AG BI (ATCC 76132)，由Dr. A. Ogoshi 提供] 及 [AG 2-3 (R6)，由Dr. S. Naito 提供)] 等進行菌絲融合的測試。首先將擬測試的菌株，培養於2% (w/v) 水瓊脂培養基(Water agar, WA)，待長出菌絲後再以打孔器沿菌落邊緣切取6 mm大小之圓盤，分別與標準菌株於含2% 水瓊脂培養基的9 cm培養皿中進行對峙培養，兩者相距約2～3 cm，置於24℃中，直到菌絲開始重疊時，於光學顯微鏡下計算菌絲融合比率。融合比率的計算公式[21] 如下：

$$\text{融合比率 (\%)} = \frac{\text{15 個顯微鏡視野中菌絲融合點總和}}{\text{15 個顯微鏡視野中菌絲接觸點總和}} \times 100$$

硫胺素 (thiamine-HCl) 需求測試：取莧菜葉枯病分離菌株RSA-01、RSA-03、RSA-04、RSA-06及RSA-09等5個菌株，以及標準菌株*R. solani* AG 2-1、AG2-2 IIIB、AG 2-2 IV及AG 2-3等4個菌株，進行硫胺素需求測試。首先將供試菌株先培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar, PDA) 培養基平板上，於24℃下培養，待菌絲長滿培養皿，切取菌落邊緣之菌絲移至WA培養基平板上，待菌絲長出後再以打孔器沿菌落邊緣切取6 mm大小之莧菜葉枯病分離菌株與標準菌株之圓盤，移至含30 ml葡萄醣醯胺天門冬酸培養基 (glucose asparagine medium, GA)[17] 的250 ml燒瓶中，另一處理組則於GA中加入濃度 10^{-5} M thiamine-HCl (Sigma, No. T-4625)。接著將燒瓶移至24℃定溫箱中，黑暗靜置培養14天後，取出菌絲團於50℃烤箱(oven) 烘乾24 hr，隨即秤量取各菌絲之乾重，每一處理四重複。

溫度對莧菜葉枯病分離菌株與標準菌株的菌絲生長影響

將莧菜葉枯病分離菌株RSA-09及*R. solani*標準菌株AG 2-1、AG 2-2 IIIB、AG 2-2 IV和AG 2-3，先行培養在PDA平板上，於24℃下三天後，沿菌落邊緣以打孔器切取直徑6 mm之菌絲塊，再移植於PDA培養基平板中央，隨後分別放置於8、12、16、20、24、28、32及36℃等不同溫度的定溫箱中，生長三天後，量取本菌在各溫度處理的菌落直徑大小，每一溫度處理四重複。另外將*R. solani*標準菌株AG 2-2 IIIB、AG 2-2 IV及莧菜葉枯病分離菌株RSA-03、RSA-09以相同的方法培養於35℃下靜置，每處理四重複，生長三天後，觀察各菌株有無菌絲生長，並量取菌落直徑大小。

莧菜葉枯病菌與標準菌株對莧菜切離葉之病原性比較

將市售之白莧菜種子播種於含栽培土之3吋盆中，於溫室(溫度範圍24～32℃) 中生長四星期時，採集莧菜之第三位葉，進行接種試驗。將莧菜葉枯病分離菌株RSA-03和RSA-09以及*R. solani*標準菌株AG 2-1、AG2-2 IIIB、AG 2-2 IV和AG 2-3培養於PDA平板，24℃四天後，以打孔器沿菌絲邊緣切取6 mm大小之圓盤，將圓盤置於莧菜切離葉片上，每葉片一個圓盤，再將葉片移至9 cm玻璃培養皿，培養皿底下放置濾紙，並加入5 ml無菌水，最後將培養皿蓋蓋上，再以石蠟膜密封，每天觀察莧菜葉片的發病情形，每處理四重複。並依下述之病害調查方法記錄罹病度(Disease severity)：

病害調查係將葉面上病斑分佈的表面積區分爲五級，0爲無病斑，1爲葉片輕微出現病斑，2爲病斑佔葉片之1/4，3爲病斑佔葉片之1/2，4爲病斑佔葉片之3/4，5爲葉片死亡[15]，然後以下列公式求得植株的罹病度：(n_1-n_5：各級罹病率的葉片數；N：總調查葉片數)

$$\text{罹病度 (\%)} = \frac{1\times n_1 + 2\times n_2 + 3\times n_3 + 4\times n_4 + 5\times n_5}{N\times 5}\times 100$$

擔孢子的收集方法

利用土壤覆蓋法[15] 產生子實層與擔孢子後，將9 cm保麗龍碗之碗底切除後，倒置於9 cm塑膠培養皿蓋之上，隨後再將土表長滿子實層之培養皿倒置於保麗龍碗底缺口處上方，24 hr後，即可收集到大量的擔孢子。隨後以5 ml之無菌水洗下培養皿蓋上的擔孢子，並以血球計數器(hemacytometer) 計數，調製成不同濃度的孢子懸浮液備用。

莧菜葉枯病之接種方法

以1% (v/v) 次氯酸鈉水溶液將白莧菜種子表面消毒30 sec後，經無菌水漂洗三次，播於3吋盆中，每盆3顆種子，置於溫室中，待長出幼苗後，每盆只保留一顆植株，經四星期後，即供作本試驗接種之用。配製莧菜分離菌株RSA-03和RSA-09不同濃度的擔孢子懸浮液 (10^2、10^3、

10^4 和 10^5 spores/ml)，以噴霧器 (Rich Star Precision Industrial Co., Ltd, Italy) 將孢子懸浮液噴霧接種於株齡四星期的莧菜葉片，每株約噴 2.5 ml，經套袋保濕一天後拆袋，於 28℃ 的植物生長箱中，維持高相對濕度 (80% RH)，接種後每隔二天觀察病害發生的情形，每一處理有四重複。並依上述病害調查方法記錄罹病度。

溫度對植株發病的影響

將莧菜分離菌株RSA-03 和RSA-09 的孢子懸浮液 (10^5 spores/ml) 分別噴霧接種於株齡四星期的莧菜葉片上，每株約噴霧 2.5 ml，套袋後置於 16、20、24、28 及 32℃ 的植物生長箱中，經套袋保濕一天後拆袋，維持高相對濕度 (80% RH)，接種 12 天後，依上述病害調查法記錄各不同溫度處理之罹病度，每一處理有四重複。

莧菜葉枯病菌的侵染過程

以打孔器切取 5 mm 大小的莧菜葉片圓盤 (株齡 28 天，由上往下算，取第三位葉) 後，將莧菜分離菌株 RSA-09 的孢子懸浮液，滴於葉片圓盤上，移置於含有濕濾紙的培養皿內保濕，置於 28℃，每 3 hr，取出葉片圓盤進行固定及透化。步驟如下: 將欲觀察的葉片圓盤置於固定液 FAA (福馬林 5 ml，冰醋酸 5 ml，及 50% 酒精 90 ml) 中，固定 24 hr 以上，再將葉片組織移至飽和的水合氯醛 (Chloral hydrate) 中進行透化，經抽氣 30 min 後，靜置4天以上，材料較多時應適時置換透化劑一至二次 [(2)]。96 hr 後，將出現水浸狀病斑的葉片，投入 1 N KOH 溶液中，於高溫高壓 (121℃, 15l b) 下透化 15 min。取出透化過的組織，以無菌水漂洗三次，移置於載玻片上，加入數滴螢光染劑 (0.05% aniline blue in 0.067 M K_2HPO_4 at pH 9.0) [(8)]，蓋上蓋玻片，以螢光顯微鏡 (Axioskop, Zeiss, Germany) 鏡檢，觀察莧菜葉枯病菌侵染葉片組織的情形。

結 果

病原菌鑑定

經由菌絲融合群測試，發現莧菜葉枯病分離菌株 RSA-03 和RSA-09 與標準菌株 *R. solani* AG 2-2 IIIB 具有高融合比率 (> 70%)；惟兩者與標準菌株 AG 2-1、AG 2-2 IV、AG 2-3 和 AG BI 的菌絲融合比率偏低 (約 < 5%)。由菌株間的融合比率觀察，確認莧菜葉枯病分離菌株 RSA-03 和RSA-09 與立枯絲核菌 *R. solani* AG 2-2 IIIB 融合群較為相近 (表一)。

葡萄醣醯胺天門冬酸培養基 (glucose asparagine medium) 液體培養基中，分別加入硫胺素 (thiamine-HCl) 與不加入硫胺素兩種處理，測試菌株對硫胺素的需求性。在 AG 2 菌絲融合亞群中，只有 AG 2-1 不需要硫胺素即可生長良好，為非營養缺陷菌; 其它融合亞群 AG2-2 IIIB、AG 2-2 IV 及 AG 2-3，皆為營養缺陷菌株，必需要有硫胺素的存在才能生長良好。本研究所收集的莧菜葉枯病分離菌株，經硫胺素需求測試後，發現該等菌株屬於硫胺素的營養缺陷菌。因此莧菜葉枯病分離菌株不歸屬於 AG 2-1 菌絲融合亞群 (表二)。綜合菌絲融合及硫胺素需求測試，

表一、莧菜葉枯病菌菌株與立枯絲核菌標準菌株 AG 2-1、AG 2-2 IIIB、AG 2-2 IV、AG BI 和 AG 2-3 的菌絲融合率

Table1. Hyphal anastomosis frequency between isolates from Chinese amaranth and standard tester isolates of *Rhizoctonia solani* AG 2-1, AG 2-2 IIIB, AG 2-2 IV, AG BI, and AG 2-3

	Hyphal fusion (%)	
Isolate	RSA-03	RSA-09
Isolates from Chinese amaranth		
RSA-03	88.9	87.7
RSA-09	—	90.0
Tester isolates of AG 2 subgroup [1]		
AG 2-1 (ATCC 76168)	1.2	3.8
AG 2-2 IIIB (ATCC 76124)	77.8	71.0
AG2-2 IV (ATCC 76125)	1.9	1.1
AG 2-3 (R6)	2.3	5.0
AG BI (ATCC 76132)	2.8	3.3

1.Supplied by Drs. Akira Ogoshi and Shigeo Naito.

表二、莧菜葉枯病菌對硫胺素的需求

Table 2. Thiamine-HCl requirement of *Rhizoctonia solani* obtained from Chinese amaranth

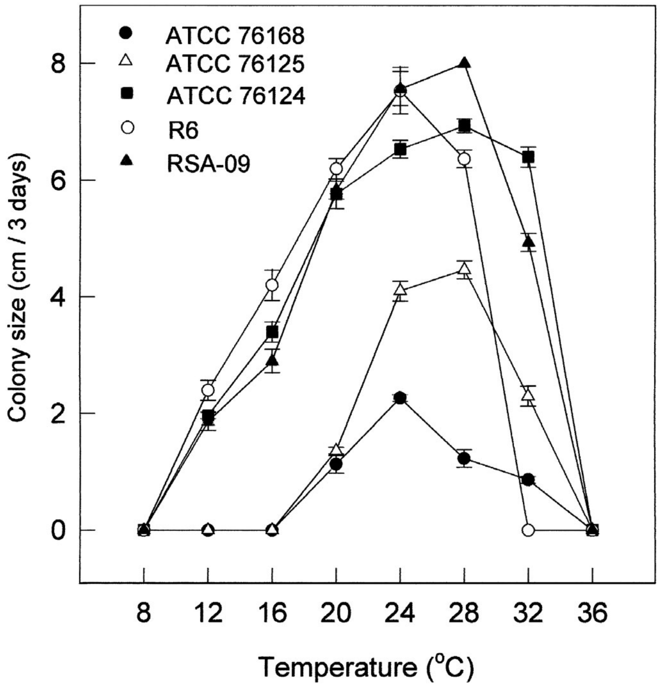
	Mycelial dry weight (mg) [2]		
Isolate	GA medium (A) [3]	GA medium + Thiamine-HCl (B) [4]	B/A
Isolates from Chinese amaranth			
RSA-01	16.7	310.3	18.6
RSA-02	26.7	273.3	10.3
RSA-03	26.7	260.8	9.8
RSA-04	13.3	296.7	22.3
RSA-09	16.7	216.7	13.0
Tester isolates of AG 2 subgroup 1			
AG 2-1 (ATCC 76168)	83.3	133.3	1.6
AG 2-2 IIIB (ATCC 76124)	13.7	210.3	15.4
AG2-2 IV (ATCC 76125)	23.3	190.3	8.2
AG 2-3 (R6)	20.3	226.7	11.6

1. Supplied by Drs. Akira Ogoshi and Shigeo Naito.
2. The fungus was cultured in 30ml liquid medium for 14 days at 24℃.
3. GA: glucose asparagine medium consisted of 10 g D-glucose, 2 g L-asparagine, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g KH_2PO_4, 0.2 mg $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, 0.2 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 mg $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ and 1L distilled water.
4. Thiamine-HCl concentration: 10^{-5} M.

可得知莧菜葉枯病菌與 *R. solani* AG 2-2 IIIB 的性狀相近似。

測試莧菜葉枯病菌RSA-09 與 *R. solani* 標準菌株之適合生長溫度，由結果得知RSA-09、AG2-2 IIIB 和AG 2-2 IV 菌株，最適生長溫度爲28℃，當溫度8～28℃時，菌絲之生長隨溫度的升高而生長較快，超過28℃後，菌絲之生長即隨溫度之升高而下降。但是AG 2-2 IV 菌株之生長速度較緩慢，在28℃，生長三天之菌落直徑爲4 cm 左右; 而相同條件下RSA-09 和AG2-2 IIIB 的菌落直徑爲7 cm 左右。另外AG 2-1 和AG 2-3 菌株，最適生長溫度爲24℃，AG 2-1 之生長速度緩慢，在24℃，生長三天之菌落直徑爲 2 cm 左右 (圖一)。至於在35℃的菌絲生長試驗中，RSA-03、RSA-09 及 AG2-2 IIIB 等三者皆可生長，惟 *R. solani* AG 2-2 IV 無法生長 (表三)。

利用菌絲圓盤接種莧菜切離葉後，於接種RSA-03 和RSA-09 菌株三天後，開始出現水浸狀褐色病斑，而接種其他測試標準菌株 *R. solani* AG 2-1、AG2-2 IIIB、AG 2-2 IV 和 AG 2-3 均無任何病徵出現。試驗持續觀察至第七天，發現RSA-03 和RSA-09 菌株可造成莧菜葉片大面積水浸狀腐爛，罹病度分別爲80% 和90%，至於AG2-2 IIIB 亦可造成水浸狀的病徵，但與莧菜葉枯病菌RSA-03 及RSA-09 相較，其危害程度較小，罹病度約爲35%。其餘



圖一、在不同溫度下莧菜葉枯病菌與標準菌株之菌絲生長速率。

Fig. 1. Mycelial growth rate of *Rhizoctonia solani* RSA-09 and standard tester isolates at various temperatures. [●: ATCC 76168 (AG 2-1), △: ATCC 76125 (AG 2-2 IV), ■: ATCC 76124 (AG 2-2 IIIB), ○: R6 (AG 2-3), ▲: RSA-09]

表三、在35℃下莧菜葉枯病菌RSA-03 和RSA-09 與標準菌株 *Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB 和AG 2-2 IV 之菌絲生長比較

Table 3. Comparison of mycelial growth between *Rhzoctonia solani* isolates RSA-03 and RSA-09 obtained from Chinese amaranth and standard tester isolates ATCC 76124 and ATCC 76125 on PDA plates at 35℃

Isolate	Colony size (mm)	
	3 days	6 days
AG 2-2 IIIB (ATCC 76124)	6.5	10.0
AG 2-2 IV (ATCC 76125)	0.0	0.0
RSA-03	4.0	4.0
RSA-09	4.0	4.0

標準菌株中，除AG 2-3 可造成輕微病徵，罹病度爲5% 外，AG 2-1 和AG 2-2 IV 均無法引起莧菜葉片出現病徵 (表四)。

擔孢子的病原性測定

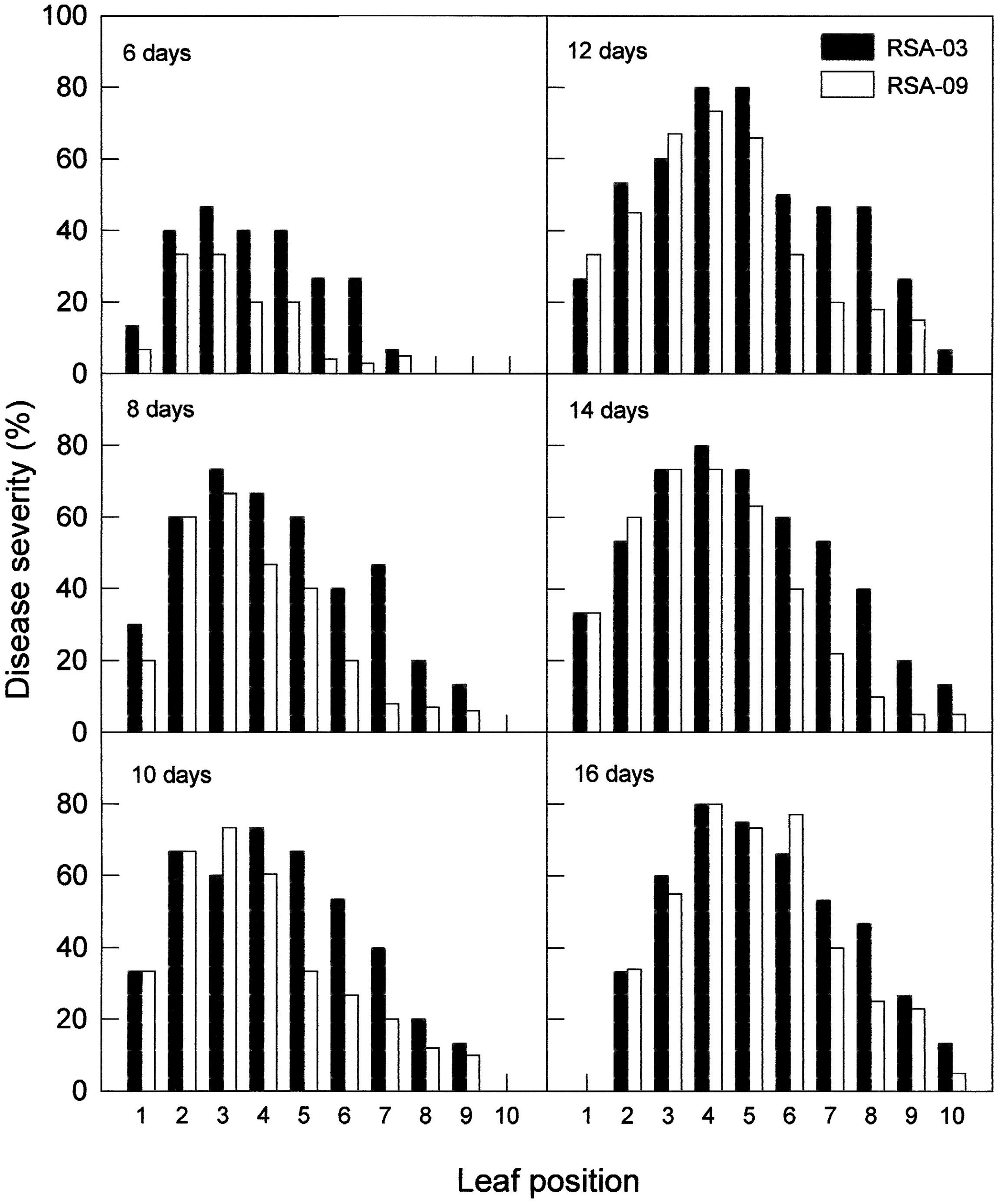
RSA-03 和 RSA-09 菌株之擔孢子懸浮液 (10^5 spores/ml) 噴佈於株齡四星期的莧菜植株葉片上，接種後的第六天葉片開始出現圓形透化斑的病徵; 接種後十二天，發現莧菜植株的第三、四和第五位葉發病較爲嚴重，罹病度皆可達到60% 以上 (圖二)。本病害的病徵分爲初期病斑及後期病斑，病徵的表現隨著時間增加而愈趨嚴重。初期病斑爲圓形水浸狀的透化小斑，病斑大小 ≦ 1 mm (圖三a)；後期病斑爲圓形或不規則形的水浸狀病斑 (圖三b)，且會由初期病斑的周圍形成爪狀的白化絲狀條斑。若

表四、莧菜葉枯病菌與標準菌株對莧菜切離葉之病原性比較

Table 4. Comparison of the pathogenicity among isolates from Chinese amaranth foliage blight and standard tester isolates of *Rhizoctonia solani* AG 2-1, AG 2-2 IIIB, AG 2-2 IV, and AG 2-3 on Chinese amaranth detached leaves

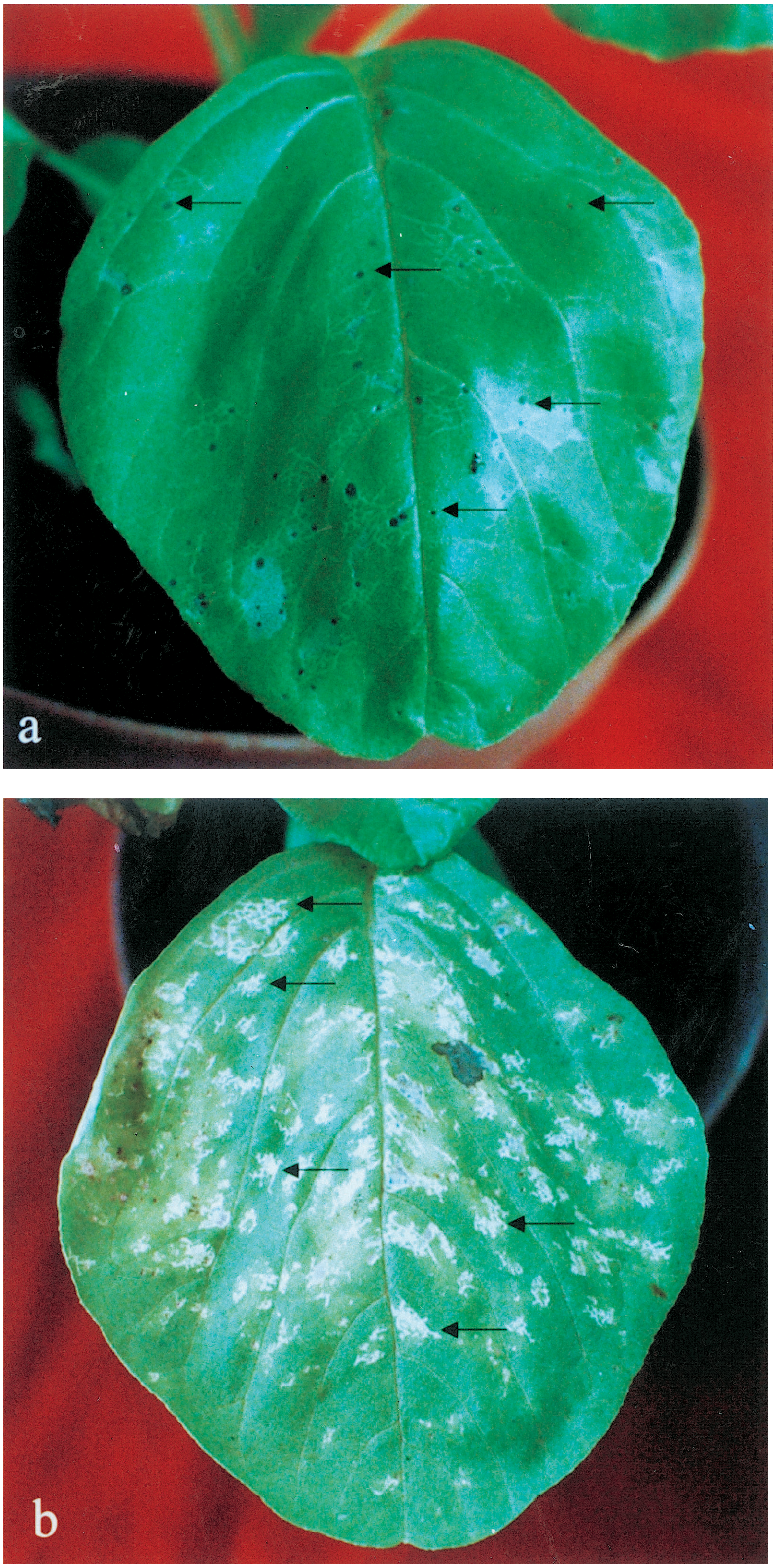
Isolate	Disease severity (%) [1]
Isolates from Chinese amaranth foliage blight	
RSA-03	80 a [3]
RSA-09	90 a
Tester isolates of AG 2 subgroup [2]	
AG 2-1 (ATCC 76168)	0 c
AG 2-2 IIIB (ATCC 76124)	35 b
AG2-2 IV (ATCC 76125)	0 c
AG 2-3 (R6)	5 c

1. Disease severity rating: 0=healthy, 1= slightly infected, 2=1/4 of the leaf is infected, 3=1/2 of the leaf is infected, 4=3/4 of the leaf is infected, and 5=leaf dead.
2. Supplied by Drs. Akira Ogoshi and Shigeo Naito.
3. Data followed by the same letter do not differ significantly (p=0.05) according to Duncan's multiple range test.



圖二、莧菜不同位葉感染莧菜葉枯病的分佈情形。

Fig. 2. Distribution of foliage blight caused by *Thanatephorus cucumeris* isolates RSA-03 and RSA-09 on Chinese amaranth plants at 28℃. Data were recorded 6 to 16 days after inoculation with basidiospores.



圖三、莧菜葉枯病的病徵：(a) 初期病斑，呈圓形、水浸狀的透化斑；(b) 初期病斑擴展成後期病斑，呈爪狀不規則型病斑。

Fig. 3. Symptoms of Chinese amaranth foliage blight caused by basidiospores of *Thanatephorus cucumeris*. (a) Initial stage of infection. Leaf with water-soaked and translucent circular lesions (arrow). (b) Advanced stage of infection. Leaf with many irregular and claw-like lesions (arrow) around the initial circular lesions.

病勢發展嚴重，病斑便會互相癒合形成較大的病斑，並可造成葉片萎凋。病害發生百分率隨接種後時間增長而愈趨嚴重，直到第十二天後，病害發生率維持高峰不再增加 (圖四)。

將株齡四星期的莧菜植株，以不同濃度的孢子懸浮液 (10^2、10^3、10^4 和 10^5 spores/ml) 進行接種試驗，在 28℃，高濕度下，經十二天後，觀察記錄第三、四和第五位的發病情形。結果發現罹病度隨著接種源濃度的增加而遞葉增，當接種源濃度爲 10^5 spores/ml 時，罹病度皆已到達 60% 以上 (圖五)。

溫度對植株發病的影響

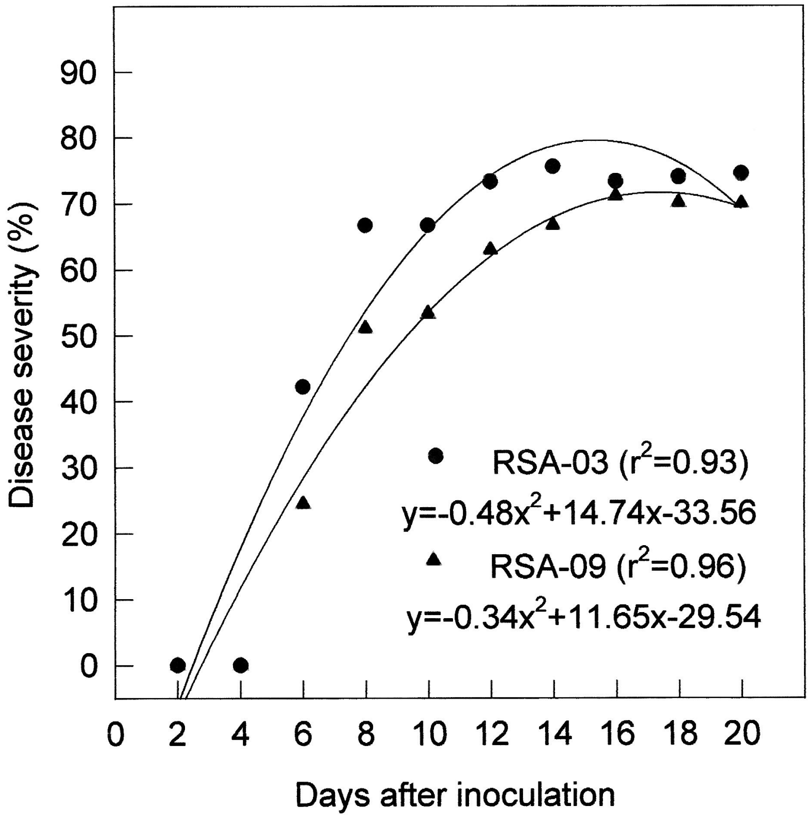
株齡四星期的莧菜植株，以RSA-03 和RSA-09 菌株的孢子懸浮液 (10^5 spores/ml) 進行噴霧接種，置於不同溫度的生長箱，並保持高濕度，經十二天後，記錄第三、四和第五位葉的發病情形。結果發現RSA-03 和RSA-09 兩菌株在溫度 16℃ 時不發病，32℃ 時發病輕微，罹病度只有 15% 左右。當溫度在 20 ~ 28℃ 之間時，罹病度隨溫度增加而遞增，溫度超過 28℃ 時，罹病度隨溫度增加而遞減。結果顯示莧菜葉枯病的最適發病溫度爲28℃ (圖六)。

莧菜葉枯病菌的侵入過程

將切離葉以孢子懸浮液進行接種後，在不同時間進行透化染色處理，觀察 *T. cucumeris* RSA-09 擔孢子侵入莧菜葉片的情形。結果發現擔孢子在接種後 3 hr 即發芽，第 9 hr 開始侵入葉表，惟不見附著器 (appressoria) 形成，18 hr 後菌絲聚集成團狀，36 hr 後出現子座般的構造，並有菌絲呈放射狀生長，此時莧菜葉片未出現肉眼可見的病徵。直到 96 hr 後，莧菜葉片開始出現圓形水浸狀病斑時，以螢光染色觀察，發現病斑中央存在有子座般的構造 (圖七)。

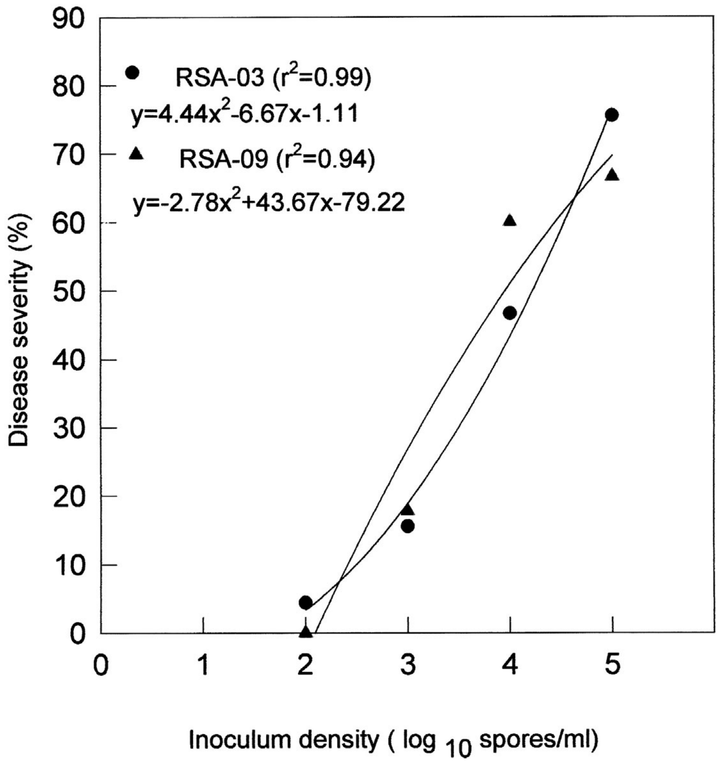
討 論

利用菌絲融合群測定，得知莧菜葉枯病分離菌株 RSA-03 和RSA-09 與標準菌株 *R. solani* AG 2-2 IIIB 具有高的菌絲融合率 (> 70%)。至於硫胺素需求測試方面，發現莧菜葉枯病菌與標準菌株AG 2-2 IIIB，皆屬於硫胺素需求營養缺陷菌。比較不同溫度對本菌菌絲生長的影響，發現RSA-09 菌株與AG 2-2 IIIB 生長速率相近，兩者最適生長溫度皆爲 28℃，且均可在 35℃ 生長。Hyakumachi 等氏



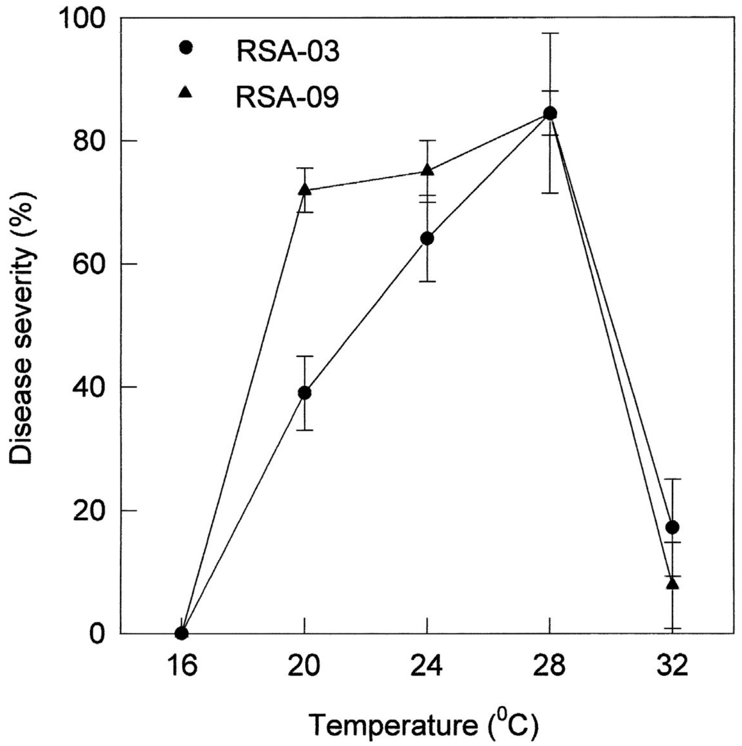
圖四、莧菜葉枯病的病勢進展。

Fig. 4. Disease progress curve of Chinese amaranth foliage blight at 28℃. Plants were sprayed wityh basidiospore suspension (10^5 spores/ml) of *Thanatephorus cucumeris* isolates RSA-03 and RSA-09.



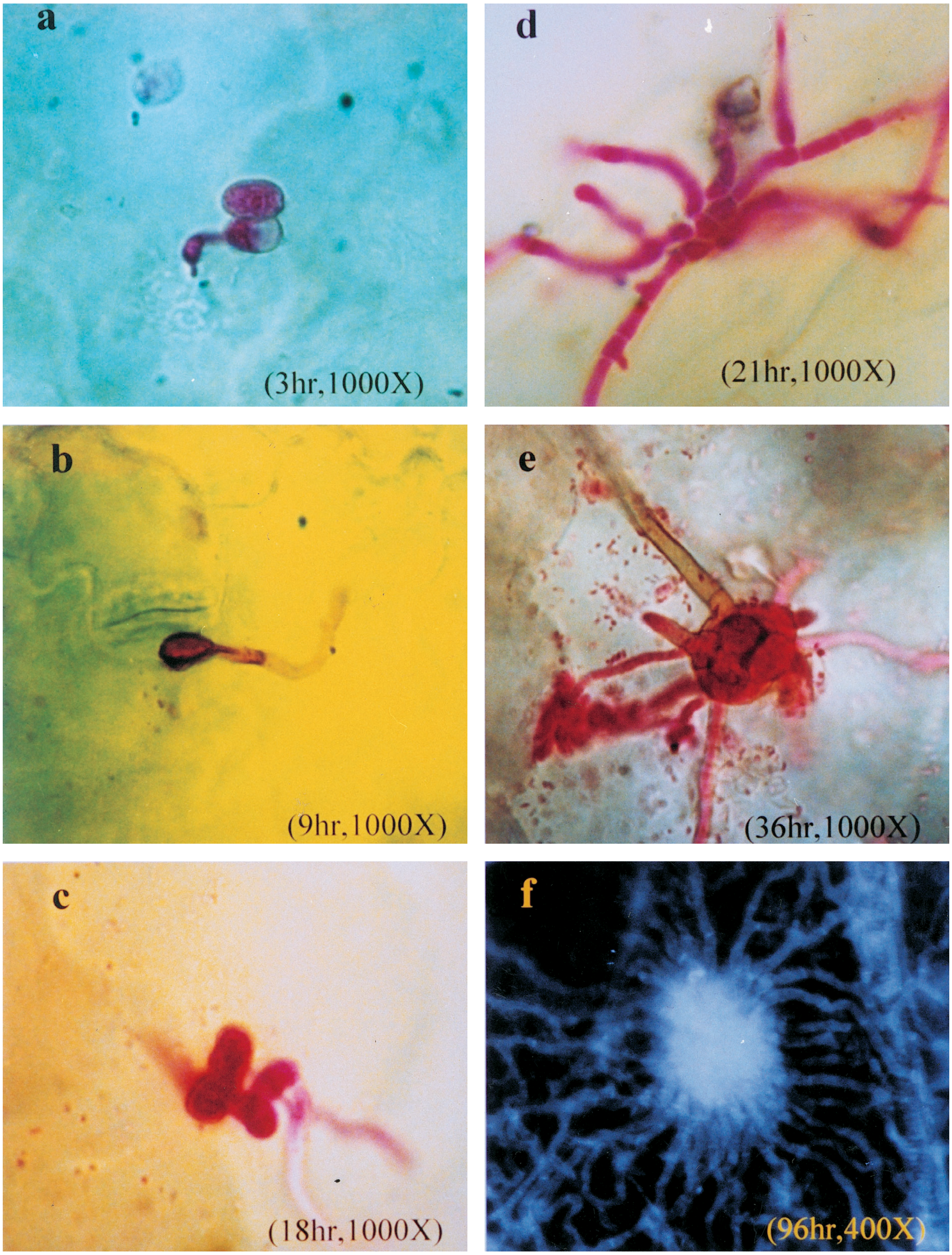
圖五、莧菜葉枯病菌接種源密度與罹病度間的關係(第十二天的結果)。

Fig. 5. Relationship between inoculum density of *Thanatephorus cucumeris* isolates RSA-03 & RSA-09 and disease severity of Chinese amaranth foliage blight. Data were recorded 12 days after inoculation.



圖六、溫度對莧菜葉枯病發生的影響(第十二天的結果)。

Fig. 6. Effect of temperatures on disease severity of Chinese amaranth foliage blight caused by *Thanatephorus cucumeris* isolates RSA-03 and RSA-09. Data were recorded 12 days after inoculation.



圖七、莧菜葉枯病菌感染莧菜的過程：(a) 接種擔孢子 3 hr 後，孢子發芽；(b) 9 hr 後可見侵入菌絲；(c) 18 hr 後團狀菌體形成；(d) 21 hr 後團狀菌體發展成子座般的構造；(e) 子座般的構造漸漸形成；(f) 利用螢光染劑染色，可觀察到子座般的構造。

Fig. 7. The time course of infection by the basidiospore of *Thanatephorus cucumeris* isolate RSA-09 on Chinese amaranth at 28 ℃ under light and fluorescent microscopes. (a) Basidiospore germination 3 hr after inoculation, (b) Penetration hypha was visible after 9 hr, (c) Formation of mass mycelia after 18 hr, (d) Development of mass mycelia into stroma-like structure after 21 hr, (e) Stroma-like structure developed completely after 36 hr, (f) Stroma-like structure was observed by fluorescent stain.

[9] 與Sneh 等氏[21] 指出*R. solani*能否在35℃生長是鑑別*R. solani* AG 2-2 IIIB 和*R. solani* AG 2-2 IV 的方法之一，即AG 2-2 IIIB 可在35℃ 生長，而AG 2-2 IV 則無法生長。在病原性試驗中，莧菜葉枯病分離菌株RSA-03 和RSA-09 爲害莧菜葉片的罹病度介於80～90% 間；標準菌株AG 2-2 IIIB 雖亦可爲害莧菜葉片，但罹病度爲35%，至於AG 2-2 IV 與AG 2-1 則不爲害莧菜。Hyakumachi 等氏[9] 指出*R. solani* 的菌絲融合群中，AG 2 又分成AG 2-1、AG 2-2 及 AG 2-3 等三個菌絲融合亞群(anastomosis subgroups)。其中融合亞群AG 2-2 之下又分成IIIB、IV 及和LP 等三個培養型(cultural types)。而區分AG 2-2 成爲三個培養型的依據是分析菌種的病原性，菌落型態及rDNA 等[9]。本研究雖未曾分析莧菜葉枯病的rDNA，但依據其與*R. solani* AG 2-2 IIIB 菌株呈高菌絲融合率，屬於硫胺素需求缺陷菌，兩者對莧菜均具致病性，且可在35℃生長等測試結果，推斷本菌似屬AG 2-2 IIIB 群。

在接種源的製備與接種技術方面，Luke 等人[5] 於棉花的莖基部發現*T. cucumeris* 的子實層，將有子實層的棉花莖部取下，移置於高濕度的濕室中，待子實層大量形成後，再將子實層放置於無菌水中，即可收集到擔孢子作爲接種源。Shew 和Main 氏[19] 將長在稻穀的*R. solani* 放在煙草植株莖基部3 cm 處，隨後以土壤覆蓋穀粒，在適合的環境下，出現*T. cucumeris* 的子實層，並可感染煙草。Naito 等人[15] 利用土壤覆蓋法，使*R. solani* 可在培養皿上的土表形成子實層，隨後他將形成子實層的培養皿，倒置於植物上方進行接種試驗，經過一段時間後，移離培養皿，將植物移至濕室，即可見植株出現病徵。綜合上述的方法，發現往昔接種*T. cucumeris* 的方法頗不方便，且又無法定量。爲了改善上述諸多不便之處，本研究特設計把培養皿蓋反置於底部，並以去除底部的保麗龍碗倒蓋於其上，然後將長滿本菌子實層的培養皿倒置於上方，24 hr 後，大量擔孢子可掉落於底部培養皿蓋內。若注入無菌水，即可配置定量的擔孢子懸浮液，作爲噴霧接種之需。

本研究得知莧菜葉枯病的發病溫度介於20～ 32℃之間，而28℃ 爲最適發病溫度，幼嫩的葉片最爲感病。病害發生之初，首先出現初期病斑，呈圓形水浸狀的透化小斑，病斑大小1 mm 左右; 接著病斑發展爲後期病斑，後期病斑爲圓形或不規則形的水浸狀病斑，病斑周圍有白化爪狀病徵出現。受擔孢子感染的葉片，經透化染色發現，擔孢子在接種3 hr 後即可發芽，9 hr 便可侵入，18 hr 後擔孢子的侵入點會有菌絲集結形成子座般(stroma-like) 的構造，並有菌絲於其周圍呈放射狀生長。許多報告指出，*T. cucumeris* 擔孢子感染甜菜[10,11]、大豆[14,15] 及煙草[18,19,20] 造成的病害，病原菌均會在感染部位形成子座般的構造。Naito 氏[12] 以無性世代*R. solani* 的菌絲斷片接種於植物葉片，並無子座構造的形成。一般推測病原菌形成子座的構造，可能與病勢的擴展有關，惟其眞正的作用機制仍不清楚。另外，植物密植時，會提高周圍環境的相對濕度，有利於*T. cucumeris* 子實層的形成、擔孢子發芽及促進病害的發生[4,15]。Naito 氏又在甜菜葉枯病的研究中得知，*T. cucumeris* 產生的擔孢子在田間經由風力傳播，擴散高度可達185 cm，傳佈距離可遠至70 公尺，主要感染植株幼嫩及中央部位的葉片；此外，擔孢子的釋放均集中在晚上至凌晨間[13]。本文對於莧菜葉枯病在田間的生態，並未深入探討，因此它的傳播方式與途徑尚待進一步研究。

引用文獻

1. 張簡秀容、張粲如. 1995. 葉菜類(莧菜). 台灣農家要覽：農作篇(二). 豐年社. 台北. 337 頁.
2. 蘇淑眞. 1993. 煙草對於煙草赤星病菌之抗病性及磷酸、碳酸鹽抑制本菌之機制. 國立台灣大學植物病蟲害學研究所病理組博士論文. 台北. 232 頁.
3. 蔡雲鵬. 1991. 台灣植物病害名彙. 中華植物保護學會、中華民國植物病理學會出版. 台中. 604 頁.
4. Baker, R. and Martinson, C. A. 1970. Epidemiology of diseases caused by *Rhizoctonia solani*. Pages 172-188 *in*: Biology and Pathology of *Rhizoctonia solani*. Parmeter, J. R. Jr., ed., Univ. California Press. Berkeley, London.
5. Luke W. J., Pinckard J. A., and Wang S. C. 1974. Basidiospore infection of cotton bolls by *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 64:107-111.
6. Hsieh, T. F., Chang, C. C., and Chang, Y. C. 1996. *Rhizoctonia* leaf spot of Chinese spinach in Taiwan. Plant Prot. Bull. 38:375-376. (Abstr)
7. Hsieh, T. F. and Lin, H. F. 1997. Distribution pattern of Chinese spinach leaf spots associated with basidiospore infection of *Thanatephorus cucumeris*. Plant Prot. Bull. 39:400. (Abstr)
8. Hood, M. E., and Shew, H. D. 1996. Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. Phytopathology 86:704-708.
9. Hyakumachi, M., Mushika, T., Ogiso, Y., Toda, T., Kageyama, K., and Tsuge, T. 1998. Characterization of a new cultural type (LP) of *Rhizoctonia solani* AG 2-2 isolated from warm-season turfgrasses, and its genetic differentiation from other cultural types. Plant Pathol. 47:1-9.
10. Naito, S., and Sugimoto, T. 1978. Basidiospore infection and lesion development on sugar beet leaves by *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 44:426-431.
11. Naito, S., and Sugimoto, T. 1980. Relationship between basidiospore dispersal of *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk and develpoment of foliage blight of sugar beets. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 46:216-223.
12. Naito, S. 1984. Studies on foliage blight of sugar beets. Res. Bull. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn. 139:145-188.

13. Naito, S. 1990. Ecological role of basidiospores of *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk in the incidence of foliage blight of sugar beets in Japan. Jpn. Agric. Res. Q. 23:268-275.
14. Naito, S., and Kanemastus, S. 1994. Characterization and pathogenicity of a new anastomosis subgroup AG 2-3 of *Rhizoctonia solani* Kuhn isolated from leaves of soybean. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 60:681-690.
15. Naito, S., Mochida, H., Nakajima, T., and Ohto Y. 1995. Infection with basidiospores of *Thanatephorus cucumeris* (AG 2-3 of *Rhizoctonia solani*) and develpoment of soybean foliar blight lesions. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 61:362-368.
16. Naito, S. 1996. Basidiospore dispersal and survival. Pages 197-205 *in*: *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular, Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Sneh, B. et al. eds. Kluwer Academic Publishers, London.
17. Ogoshi, A., and Ui, T. 1979. Specificity in vitamin requirement among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 45:45-33.
18. Shew H. D., and Main C. E. 1985. Rhizoctonia leaf spot of flue-cured tobacco in North Carolina. Plant Dis. 69:901-903.
19. Shew, H. D., and Main, C. E. 1990. Infection and development of target spot of flue-cured tobacco caused by *Thanatephorus cucumeris*. Plant Dis. 74:1009-1013.
20. Shew, H. D., and Melton, T. A. 1995. Target spot of tobacco. Plant Dis. 79:6-11.
21. Sneh, B., Burpee, L., and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species, APS Press, St. Paul, MN. 133pp.

ABSTRACT

Lin, H. F. [1], Hsieh. T. F. [2], and Huang. J. W. [1,3] 2002. Characterization and infection of *Thanatephorus cucumeris* causing the Chinese amaranth foliage blight. Plant Pathol. Bull. 11:33-44. ([1.] Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan, R.O.C.; [2.] Department of Plant Pathology, Taiwan Agaricultural Research Institute, Wu-feng 413, Taiwan.; [3.] Corresponding author, Email: jwhuang@dragon.nchu.edu.tw, Fax No: +886-4-22851676.)

A new foliage blight of Chinese amaranth (*Amaranth mangotanus* L.) was frequently observed in organic farms during the summer season in Taiwan. The hyphae of RSA-03 and RSA-09 isolated from diseased Chinese amaranth leaves were able to form anastomosis in high frequency (> 70%) with *R. solani* AG 2-2 IIIB, but in low frequency (< 5%) with *R. solani* AG 2-1, AG 2-2 IV, AG 2-3 and AG BI. When five isolates from Chinese amaranth were individually cultured in liquid glucose asparagine (GA) medium with or without thiamine-HCl, all of them were found to be auxotrophic for thiamine-HCl and more closely resembled *R. solani* AG 2-2 IIIB. The optimum temperature for mycelial growth of RSA-09 was also similar to that of *R. solani* AG 2-2 IIIB. Inoculation tests revealed that RSA-03, RSA-09 and *R. solani* AG 2-2 IIIB were pathogenic to Chinese amaranth. Based on the anastomosis, thiamine-HCl requirement, growth temperature, and pathogenicity tests, the isolates from Chinese amaranth foliage blight were identified as *R. solani* AG 2-2 IIIB. When Chinese amaranth plants were sprayed with basidiospores produced by RSA-03 or RSA-09, small, circular water-soaked spots appeared on leaves within six days. Subsequently, the lesions enlarged and became necrotic and irregular in shape. Basidiospores germinated on leaves and penetrated into the epidermal cell walls nine hours after inoculation. The pathogen formed mycelial masses in 18 hr and stroma-like structures in 21 hr after inoculation.

Key words: anastomosis, basidiospore, Chinese amaranth, foliage blight, infection process, *Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB, *Thanatephorus cucumeris*.